

**PENGARUH GEL EKSTRAK ETANOL DAUN KAMBOJA (*Plumeria
acuminate*) TERHADAP JUMLAH LIMFOSIT PADA PROSES
PENYEMBUHAN ULKUS MUKOSA *Rattus norvegicus***

SKRIPSI

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Gigi**



Oleh :

Herlina Kartikasari

NIM: 125070407111009

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER GIGI

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2016

DAFTAR ISI

	Halaman
Judul	i
Halaman Pengesahan	ii
Kata Pengantar	iii
Abstrak	v
Abstract	vi
Daftar Isi	vii
Daftar Gambar	xi
Daftar Tabel	xii
Daftar Lampiran	xiii
Daftar Singkatan	xiv
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Kamboja (<i>Plumeria acuminata</i>)	6
2.1.1 Kamboja	6
2.1.2 Taksonomi	6
2.1.3 Kandungan	7
2.1.3.1 Saponin	7
2.1.3.2 Fenol	8
2.1.3.3 Tanin	8

2.1.3.4 Minyak Astiri	9
2.1.3.5 Flavonoid	9
2.1.4 Manfaat Daun Kamboja	11
2.2 Ulkus Traumatik	11
2.2.1 Definisi	11
2.2.2 Klasifikasi	12
2.2.3 Diagnosis	15
2.3 Proses Penyembuhan Ulkus	16
2.4 Limfosit	19
2.5 Sediaan Gel	21
2.6 Triamcinolone Acetonide 0,1%	23
2.7 Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	23
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1 Kerangka Konsep	25
3.2 Hipotesis Penelitian	26
BAB IV METODOLOGI PENELITIAN	
4.1 Rancangan dan Desain Penelitian	27
4.2 Sampel Penelitian	27
4.3 Variabel Penelitian	29
4.4 Tempat dan Waktu Penelitian	29
4.5 Bahandan Alat Penelitian	29
4.5.1 Bahandan Alat untuk Ulserasi	30
4.5.2 Bahandan Alat untuk Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Kamboja (<i>Plumeria acuminata</i>)	30

4.5.3	Bahan dan Alat untuk Pembuatan Gel Ekstrak Etanol Daun Kamboja (<i>Plumeria acuminata</i>).....	30
4.5.4	Bahan dan Alat Perlakuan	31
4.5.5	Bahan dan Alat Pengambilan Jaringan dan Pembuatan Preparat.....	31
4.6	Definisi Operasional.....	32
4.7	Prosedur Penelitian atau Pengumpulan Data	33
4.7.1	Ulserasi Pada Mukosa Labial Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>).....	33
4.7.2	Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Kamboja (<i>Plumeria acuminata</i>).....	33
4.7.3	Pembuatan Gel Ekstrak Daun Kamboja (<i>Plumeria acuminata</i>).....	34
4.7.4	Pengaplikasian Gel Ekstrak Etanol Daun Kamboja (<i>Plumeria acuminata</i>) dan Triamcinolone acetonide 0,1%	34
4.7.5	Pembuatan Preparat	35
4.7.6	Identifikasi Limfosit.....	37
4.8	Kerangka Operasional	38
4.9	Analisis Data	39

BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1	Hasil Penelitian	40
5.2	Analisi Data	43
5.2.1	Uji Normalitas Data	43
5.2.2	Uji Homogenitas Ragam	44
5.2.3	Uji One Way Anova.....	44

5.2.3 Uji Post Hoc Tukey.....	46
-------------------------------	----

BAB VI PEMBAHASAN	47
--------------------------------	----

BAB VII PENUTUP	51
------------------------------	----

7.1 Kesimpulan.....	51
---------------------	----

7.2 Saran	52
-----------------	----

DAFTAR PUSTAKA	53
-----------------------------	----



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Ulkus merupakan suatu lesi umum yang sering dijumpai di bidang kedokteran gigi (Regezi, 2008). Ulkus merupakan suatu keadaan patologis dimana terjadi kerusakan seluruh lapisan epitel dan jaringan dibawahnya, dilapisi oleh gumpala fibrin, sehingga berwarna putih kekuningan (Birnbbaum dan Dunne, 2009; Burket dkk 2008). Ulkus yang paling sering terjadi pada rongga mulut adalah ulser traumatik (De Long, 2008). Ulkus traumatik adalah bentukan lesi ulseratif yang disebabkan oleh adanya trauma. Ulkus traumatik dapat terjadi pada semua usia dan pada jenis kelamin. Lokasinya biasanya di mukosa pipi, mukosa bibir, palatum dan tepi perifer lidah. Ulkus traumatik disebabkan oleh trauma berupa bahan-bahan kimia, panas, listrik atau gaya mekanik (Langlais dan Miller, 2000).

Salah satu pengobatan yang digunakan untuk penyembuhan pada ulkus rongga mulut adalah menggunakan *Triamcinolone acetonide 0,1%* memiliki efek inflamasi, antialergi, dan analgesik sehingga dapat mempercepat penyembuhan ulkus dan mengurangi keparahan lesi (Scully, 2006). Tetapi dalam penggunaannya obat ini memiliki efek samping lokal berupa penipisan kulit, perburukan kondisi infeksi, dan dermatitis kontak (MIMS Dermatology Resource, 2007). Sehingga diperlukan alternatif pengobatan yang lain.

Di Indonesia banyak tanaman yang berkhasiat mengobati berbagai macam penyakit. Salah satunya adalah penggunaan ekstrak etanol daun kamboja (*Plumeria acuminata*) pada penyembuhan luka gingiva. Berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Fachrurrozi (2013) membuktikan secara signifikan bahwa daun kamboja mempunyai aktivasi antiinflamasi yang dapat meningkatkan ketebalan epitel dan jumlah fibroblas. Menurut hasil uji FMIPA UNUD (2014) pada ekstrak daun kamboja (*Plumeria acuminata*) kandungan yang sudah teridentifikasi yaitu mengandung senyawa saponin, steroid, fenol, tanin, glikosida, minyak atsiri, dan flavonid. Dari kandungan ekstrak etanol daun kamboja (*Plumeria acuminata*) yang sudah teridentifikasi, kandungan yang dapat menjadi alternatif dalam menyembuhkan ulkus adalah flavonoid. Flavonoid berfungsi merangsang rekutmen sel radang, salah satunya adalah limfosit (Titi Santi, 2005). Selain itu pemberian frekuensi konsentrasi gel ekstrak etanol daun kamboja (*Plumeria acuminata*) sebesar 10% mampu menurunkan jumlah PMN pada proses penyembuhan luka pada gingiva (Hapsariani, 2012).

Prinsip penyembuhan ulkus pada dasarnya sama dengan proses penyembuhan luka. 3 tahap dalam proses penyembuhan luka, yaitu fase inflamasi, fase proliferasi, dan fase remodeling. Fase inflamasi akan terjadi mulai terjadinya jejas sampai hari kelima dan mencapai puncaknya pada hari ketujuh. Pada beberapa penelitian, limfosit ikut berperan dalam penyembuhan luka. Limfosit akan melepaskan limfokin (interferon- γ) yang berperan terhadap agregasi makrofag. Makrofag yang telah teraktivasi, menghasilkan Nitrit oksida (NO) dan Reactive Oxygen Spesies

(ROS) yang berperan dalam fagositosis. Makrofag juga melepaskan faktor pertumbuhan, yaitu *Fibroblas Growth Factor* (FGF), *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF), *Transforming Growth Factor* (TGF- β), dan *Epidermal Growth Factor* (EGF) yang berfungsi meningkatkan proliferasi fibroblas yang selanjutnya dapat meningkatkan sintesa serat-serat kolagen, serta *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) yang mengawali dan mempercepat pembentukan formasi jaringan granulasi berupa, fibroblas dan angiogenesis sehingga terjadi penyembuhan luka (Alderton, 2001 ;Robbins 2013). Kandungan flavonoid yang terdapat dalam ekstrak etanol daun kamboja (*Plumeria acuminata*) berfungsi merangsang rekrutmen sel radang, salah satunya adalah limfosit yang akan meningkatkan aktivasi makrofag yang juga akan meningkatkan aktivasi fagositosis serta proliferasi fibroblas dan angiogenesis, sehingga proses penyembuhan ulkus meningkat.

Berdasarkan latar belakang diatas, peneliti ingin meneliti pengaruh gel ekstrak etanol daun kamboja (*Plumeria acuminata*) terhadap jumlah limfosit pada proses penyembuhan ulkus mukosa *Rattus norvegicus*. Dalam penelitian ini, ulserasi pada mukosa *Rattus norvegicus* dibuat dengan cara induksi panas yang dihasilkan ujung *cement stopper* kedokteran gigi (Setyaningtyas, 2012).

1.2 Rumusan Masalah

Apakah gel ekstrak etanol daun kamboja (*Plumeria acuminata*) berpengaruh terhadap jumlah limfosit pada proses penyembuhan ulkus mukosa *Rattus norvegicus* yang diinduksi panas?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh gel ekstrak etanol daun kamboja (*Plumeria acuminata*) terhadap peningkatan jumlah limfosit pada proses penyembuhan ulkus mukosa *Rattus norvegicus* yang diinduksi panas.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Menghitung jumlah limfosit dalam proses penyembuhan ulkus mukosa *Rattus norvegicus* yang diinduksi panas dan tidak diberikan perlakuan pada hari ke 5.
2. Menghitung jumlah limfosit dalam proses penyembuhan ulkus mukosa *Rattus norvegicus* yang diinduksi panas setelah aplikasi *Triamcinole acetonide* 0,1% pada hari ke 5.
3. Menghitung jumlah limfosit dalam proses penyembuhan ulkus mukosa *Rattus norvegicus* yang diinduksi panas setelah aplikasi gel ekstrak etanol daun kamboja (*Plumeria acuminata*) konsentrasi 10% pada hari ke 5.
4. Menganalisa perbedaan jumlah limfosit dalam proses penyembuhan ulkus mukosa *Rattus norvegicus* yang diinduksi panas setelah aplikasi *Triamcinole acetinide* 0,1% dan setelah aplikasi gel ekstrak etanol daun kamboja (*Plumeria acuminata*) konsentrasi 10% pada hari ke 5.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

Menambah referensi, informasi, dan wawasan ilmu pengetahuan mengenai pengaruh gel ekstrak etanol daun kamboja (*Plumeria acuminata*) terhadap peningkatan jumlah limfosit pada proses penyembuhan ulkus mukosa *Rattus norvegicus* yang diinduksi panas.

1.4.2 Manfaat Peneliti

Menambah dan memperluas wawasan penulis mengenai pengaruh gel ekstrak etanol daun kamboja (*Plumeria acuminata*) terhadap peningkatan jumlah limfosit pada proses penyembuhan ulkus mukosa *Rattus norvegicus* yang diinduksi panas.

1.4.3 Manfaat Praktis

Memberi informasi ilmiah dan alternatif pengobatan kepada masyarakat mengenai penggunaan obat alamiahgel ekstrak etanol daun kamboja (*Plumeria acuminata*) terhadap proses penyembuhan ulkus pada mukosa rongga mulut.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kamboja (*Plumeria acuminata*)

2.1.1 Kamboja

Tanaman kamboja (*Plumeria acuminata*) merupakan salah satu contoh famili *Apocynaceae*. Kamboja (*Plumeria acuminata*) diketahui merupakan tumbuhan yang berasal dari Amerika Tengah, Meksiko, Kepulauan Karibia dan Amerika Selatan. Kamboja dapat tumbuh di daerah tropis dan subtropis (Tjitrosoepomo, 2000).

Daun kamboja (*Plumeria acuminata*) berbentuk lanset dengan ujung dan pangkal daun meruncing serta bentuk daunnya memanjang, berwarna hijau dan tebal, serta tulang daunnya menonjol. Panjang daun berukuran 15-20 cm. Sementara lebar daunnya berkisar 6-12,5 cm). Bunga kamboja (*Plumeria acuminata*) memiliki ukuran diameter 8-12 cm. Mahkota bunga umumnya berjumlah lima helai dan memiliki wangi yang khas. Mahkota bunga mempunyai corong dengan lingkaran yang sempit dan sisi bagian dalamnya berambut halus. Bentuk mahkotanya pun tidak monoton, ada yang bertajuk lebar hingga bulat serta mahkota panjang yang sempit dan berpilin (menggulung) (Wijayakusuma, 2000).

2.1.2 Taksonomi

Divisi : *Spermatophyta*

Subdivisi : *Angiospermae*

Kelas : *Dicotyledoneae*

Bangsa : *Apocynales*

Suku : *Apocynaceae*

Marga : *Plumeria*

Jenis : *Plumeria acuminata*, Ait

(Tjitrosoepomo, 2000)

2.1.3 Kandungan Daun Kamboja

Menurut hasil uji FMIPA UNUD (2014) pada ekstrak daun kamboja (*Plumeria acuminata*) kandungan yang sudah teridentifikasi yaitu mengandung senyawa saponin, steroid, fenol, tannin, glikosida, minyak astiri, dan flavonid. Dari kandungan ekstrak daun kamboja yang sudah teridentifikasi, kandungan yang dapat menjadi alternatif dalam menyembuhkan ulkus traumatik yaitu flavonoid.

2.1.3.1 Saponin

Saponin adalah senyawa aktif permukaan yang kuat yang menimbulkan busa jika dikocok dalam air. Mula-mula disebut saponin karena sifatnya yang khas menyerupai sabun. Saponin adalah suatu glikosida yang mungkin ada pada banyak macam tanaman. Saponin memiliki kegunaan dalam pengobatan, terutama karena sifatnya yang mempengaruhi absorpsi zat aktif secara farmakologi. Beberapa jenis saponin bekerja sebagai antimikroba (Masroh, 2010).

2.1.3.2 Fenol

Senyawa fenol adalah kelompok senyawa kimia yang ditemukan sangat luas pada tanaman. Senyawa ini memiliki ciri khas yakni memiliki gugus fenol pada molekulnya, dan berperan dalam memberi warna pada tumbuhan seperti warna daun saat musim gugur. Dari sejumlah penelitian pada tanaman obat dilaporkan banyak tanaman obat yang mengandung fenol dalam jumlah besar. Efek bioaktif terutama disebabkan karena adanya senyawa fenol seperti flavonoid dan asam fenolat. Biasanya senyawa-senyawa yang memiliki efek bioaktif adalah senyawa fenol yang mempunyai gugus hidroksi yang tersubstitusi pada posisi ortho dan para terhadap gugus—OH dan —OR (Okawa et al, 2001). Fenol berguna sebagai antiseptik untuk mengurangi radang (Mooryadi, 2000).

2.1.3.3 Tanin

Menurut Hagerman (2002), ada dua jenis tanin yaitu *hydrolysable tannin* dan *condensed tannin*. *Hydrolysable tannin* adalah senyawa tannin yang dapat dihidrolisis dengan asam, alkali atau enzim menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana seperti gula dan asam tanat (asam galat dan elagat). *Condensed tannin* disebut juga proanthosianidin merupakan tanin yang tersusun dari flavonoid seperti katekin atau epikatekin, contohnya prosianidin B-2.

Tanin juga berfungsi sebagai desinfektan yang mampu menghambat pertumbuhan organisme (bakteriostatik) dan mampu mematikan suatu organisme (Harboune, 1989).

2.1.3.4 Minyak Atsiri

Minyak atsiri disebut juga minyak eteris adalah minyak yang bersifat mudah menguap, yang terdiri dari campuran yang mudah menguap, dengan komposisi dan titik didih berbeda-beda. Setiap substansi yang dapat menguap memiliki titik didih dan tekanan uap tertentu dalam hal ini dipengaruhi oleh suhu. Pada umumnya tekanan uap yang rendah dimiliki oleh persenyawaan yang memiliki titik didih tinggi (Guenther, 2006).

2.1.3.5 Flavonoid

Flavonoid adalah suatu kelompok senyawa fenol terbesar yang ditemukan di alam. Senyawa ini merupakan zat warna merah, ungu dan biru dan sebagai zat warna kuning yang ditemukan dalam tumbuhan (Lenny, 2006). Di alam, dikenal adanya sejumlah besar flavonoid yang berbeda-beda dan merupakan pigmen kuning yang tersebar luas di seluruh tanaman tingkat tinggi. Rutin, kuersetin, sitrus bioflavonoid (termasuk hesperidin, hesperetin, diosmin, dan naringenin) merupakan kandungan flavonoid yang paling dikenal. Rutin dan hesperidin dinamakan vitamin P atau faktor permeabilitas. Rutin dan hesperidin pernah digunakan dalam pengobatan berbagai kondisi yang ditandai oleh pendarahan kapiler dan peningkatan kerapuhan kapiler (Gunawan, 2004).

Menurut Figuera et al (2003), daun (*Plumeria accuminata*) mengandung campuran flavonoid atau tannin terkondensasi atau terpolimerisasi, seperti antosianidin, katekin, leukoantosianidin yang kadang-kadang terikat dengan glukosa. Flavonoid memiliki kemampuan

imunomodulator yang dapat meningkatkan produksi IL-2 (interleukin 2).

IL-2 merangsang proliferasi dan diferensiasi sel T. Kemudian sel T berdiferensiasi menjadi Th1 (T helper 1). Sel Th1 mensekresi berbagai macam produk antara lain IFN- γ (interferon gamma) yang potensial mengaktivasi makrofag (Titi Santi, 2005). Makrofag yang aktif berfungsi untuk melakukan fagositosis, memproduksi TNF, perbaikan jaringan (*fibroblast stimulating factor*, *fibronectin*, *kolagenase*), sitokin, dan memproduksi hormon pertumbuhan (*growth factor*). *Growth factor* ini bertanggung jawab atas terjadinya inflamasi dan proses mitogen fibroblas yang penting dalam proses penyembuhan luka (Simatupang, 2003). Flavonoid juga memiliki efek antiinflamasi serta antibakteri yang mencegah terjadinya infeksi sehingga dapat mempercepat proses penyembuhan luka (Poetri, 2009; Nurul, 2008). Mekanisme antiinflamasi terjadi melalui efek penghambatan pada jalur metabolisme asam arakhidonat, pembentukan prostaglandin, pelepasan histamin pada radang (Loggia dkk 1986, at Nurika 2009). Selain itu, flavonoid dapat meningkatkan fungsi biologis tubuh seperti sintesis protein, diferensiasi sel, proliferasi, angiogenesis, meningkatkan mitosis fibroblas (Wenny, 2010).

2.1.4 Manfaat Daun Kamboja



Gambar 2.1 Daun Kamboja (*Plumeria acuminata*), (Mursito, B. dan Prihmantoro, H. 2011)

Kamboja bisa menjadi ramuan tradisional dengan berbagai kelebihan yang dimilikinya. Mulai dari bunga hingga daun kamboja bisa dijadikan ramuan tradisional untuk mengobati banyak Obat tradisional yang murah, mudah didapat, tapi kaya khasiat. Penyakit yang dapat disembuhkan yakni mengurangi sakit akibat bengkak, antibakteri, obat sakit gigi, bisul, kutil, rematik atau asam urat, disentri, demam, batuk, telapak kaki pecah-pecah (Mursito dan Prihmantoro, 2011).

2.2 Ulkus Traumatik

2.2.1 Definisi

Ulkus adalah suatu defek pada jaringan epitel berupa lesi cekung berbatas jelas yang telah kehilangan lapisan epidermis (Greenberg, 2003). Ulkus adalah luka terbuka dari kulit atau jaringan mukosa yang memperlihatkan diintegritas dan nekrosis

jaringan yang sedikit demi sedikit (Langlais, 2000). *Traumatic ulcer*

adalah suatu ulkus yang disebabkan oleh trauma (Mosby, 2008).

Bentukan lesi ulseratif yang disebabkan oleh adanya trauma mekanik, suhu, elektrik, maupun kimia, lokasinya biasanya pada mukosa bibir, palatum dan tepi perifer dari lidah (Neville, 2009).

2.2.2 Klasifikasi

1. Ulkus Traumatik Mekanis

Ulkus yang disebabkan trauma mekanis terhadap oral mukosa, kebanyakan sembuh dalam hitungan hari. Biasanya disebabkan oleh permukaan tajam seperti tepi protesa, peranti ortodonti, *accodental biting* pada saat mastikasi, sikat gigi yang terlalu keras, tusuk gigi, atau alat makan seperti garpu. Ulkus bersifat sakit, dikelilingi oleh eritema, dasarnya ditutupi oleh *exudates fibrous* dan pada *stage* berikutnya oleh jaringan granulasi dan *regenerating ephithelium* (Neville, 2009).



Gambar 2.2 Ulkus Traumatik Mekanis (Neville *et al*, 2009)

2. Ulkus Traumatik Elektrik

Terdapat dua tipe ulkus traumatik elektrik yaitu *contact burns* dan *arc type*. *Contact burns* membutuhkan suatu pijakan

yang baik dan mencakup arus elektrik dari tubuh ke tanah.

Electric current bisa menyebabkan *cardiopulmonary arrest* dan bisa berakibat fatal. Pada *act type* saliva berperan sebagai medium penghantar dan lengkungan elektrik mengalir diantara sumber energi dan mulut (Neville, 2009)

Rongga mulut yang sering terkena adalah bibir. Bagian yang terbakar seringkali sakit, charred, daerah kekuningan dengan atau tanpa pendarahan, edema bisa muncul segera dan bertahap hingga 12 hari. Pada hari ke-4, area yang terinfeksi menjadi nekrotik dan mulai mengelupas, kadang terjadi pendarahan. Gigi yang berdekatan dengan area yang terinfeksi bisa menjadi nonvital dengan atau tanpa nekrosis yang mengelilingi tulang alveolar. Pasien yang terkena sengatan elektrik bertegangan tinggi bisa terjangkit *facial nerve paralysis* dan biasanya sembuh dalam beberapa minggu-bulan (Neville, 2009).



Gambar 2.3 Ulkus Traumatik Elektrik (Neville et al, 2009)

3. Ulkus Traumatik Termal

Etiologi ulkus traumatik termal pada rongga mulut biasanya berasal dari makanan atau minuman yang panas. Luka yang berhubungan dengan *thermal food burns* biasanya tampak pada palatum atau mukosa bukal posterior. Lesi tampak sebagai zona eritema dan ulserasi biasanya muncul pada epitel yang nekrotik biasanya muncul pada epitel yang nekrotik. Ulkus traumatik biasanya sembuh tanpa perawatan (Neville, 2009).

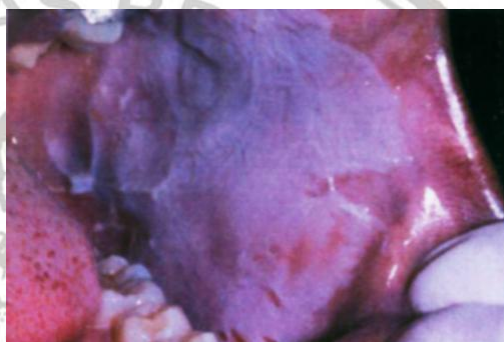


Gambar 2.4 Ulkus Traumatik Akibat Makanan Panas (Neville et al, 2009)

4. Ulkus Traumatik Kimia

Kerusakan mukosa terjadi akibat obat-obatan topikal untuk mengatasi sakit gigi atau luka di mulut. Produk yang mengandung phenol, hidrogen peroksida atau eugenol memberikan reaksi merugikan pada pasien. Penggunaan material kaustik seperti *silver nitrate*, *formekresol*, *sodium hypoklorit*, *paraformaldehyde*, *chromic acid*, *trichloroacetic acid*, *dental cavity varnishes*, dan *acid etch* semuanya bisa menyebabkan luka pada pasien (Neville, 2009).

Dibutuhkan pengetahuan dan penggunaan *rubber dam* untuk mengurangi terjadinya luka. Untuk mencegah saat menggunakan obat-obatan yang berpotensi kaustik (aspirin, *chlorpromazine*) dokter gigi harus menginstruksikan pasien untuk menelan obatnya dan tidak boleh membiarkannya dalam waktu yang lama di rongga mulut. Anak-anak tidak boleh mengunyah aspirin segera sebelum tidur dan harus berkumur setelah menggunakannya (Neville, 2009).



Gambar 2.5 Ulkus Traumatik Kimiawi, (Neville *et al*, 2009)

2.2.3 Diagnosis

Secara garis besar, ulkus diklasifikasikan menjadi akut dan kronik. Gambaran klinis pada ulkus akut adalah rasa sakit yang bervariasi, dasar putih atau kekuningan dengan halo eritema, memiliki riwayat trauma, bengkak, kemerahan dan akan sembuh secara fisiologis dalam 7-10 hari. Pada ulkus yang kronik hanya menimbulkan sedikit atau bahkan tanpa rasa sakit, dasar berwarna kekuningan, meninggalkan bekas luka atau scar, jika terkena iritasi akan terjadi keterlambatan proses penyembuhan khususnya lesi pada lidah, dan secara klinis sebenarnya mirip karsinoma atau ulkus yang infeksi (Regezi *et al*, 2012).

Ulkus traumatik jenis akut bisa ditegakkan diagnosanya lewat gambaran klinis, hubungan sebab akibat, dan riwayat dari lesi. Namun jika ada sebab yang tidak jelas, perlu dilakukan pemeriksaan penunjang. Jenis lesi dari ulkus kronik tidak bisa secara langsung ditegakkan karena punya gambaran klinis yang tidak khas sehingga terdapat diagnosis banding seperti kondisi infeksi (syphilis, TBC, dan infeksi jamur yang dalam). Lesi kronik bisa dilihat proses penyembuhannya sekitar 2 minggu dengan catatan pasien dapat menjaga kebersihan gigi dan mulutnya dengan baik. Jika lebih dari waktu tersebut lesi tidak semakin membaik dan melebar, maka perlu dilakukan biopsi (Regezi et al, 2012).

2.3 Proses Penyembuhan Ulkus

Secara garis besar berikut merupakan proses penyembuhan luka (Mitchell dan Cotran, 2010):

1. Inflamasi

Suatu respon protektif yang bertujuan menghilangkan penyebab awal jejas dan membuang baik sel maupun jaringan yang menyebabkan sel menjadi nekrotik (debris, bakteri, organisme lain). Tanda dari peradangan ini ada 5 yaitu panas (kalor), kemerahan (rubor), dan bengkak (tumor), serta 2 tambahannya yaitu nyeri (dolor) dan kehilangan fungsi (functio laesa), hal tersebut dikarenakan keluarnya sel yang berperan di dalamnya beserta mediator kimiawi. Pada tahap jejas sel awal, pertahanan pertama yang keluar adalah leukosit yang didominasi oleh neutrofil (pada hari pertama sampai hari ke-3). Ketika ada jejas, proses inflamasi langsung terjadi dengan respon pertama

mengeluarkan PMN, tugas utamanya adalah memfagosit bakteri yang berjalan dari 24-48 jam pertama, jika tidak terjadi infeksi maka jumlah PMN akan menurun setelah hari ke-3. Respon imun seluler yang kedua adalah makrofag yang dikeluarkan oleh monosit sekitar 48 jam setelah adanya jejas. (Baratawidjaja K.G dan Rengganis I, 2009; Mitchell dan Cotran, 2010). Sesudah makrofag, muncul limfosit T dengan jumlah bermakna pada hari kelima. Makrofag dan limfosit T penting keberadaannya pada penyembuhan luka. Limfosit dan makrofag memfagositosis dan mencerna organisme-organisme patologis dan sisa-sisa jaringan.

Produk biologis makrofag, *growth factor* yang berperan dalam penyembuhan luka:

- a. *Fibroblas Growth Factor* (FGF); mengawali terbentuknya jaringan granulasi berupa fibroblas dan pembentukan pembuluh darah baru.
- b. *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF); menyebabkan migrasi dan proliferasi fibroblas, sel otot polos dan monosit, meningkatkan penyembuhan secara in vitro.
- c. *Transforming Growth Factor* (TGF- β); merupakan produk dari trombosit, sel T, endothelium dan makrofag, sebagai penghambat pertumbuhan yang memicu kemotaksis dan produksi serta degradasi kolagen.
- d. *Epidermal Growth Factor* (EGF); meningkatkan proliferasi sel fibroblas yang nantinya akan mensintesis serat-serat kolagen.
- e. *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF); angiogenesis.

f. Nitrit Oksida (NO) dan Reactive Oxygen Spesies (ROS);

memfagositosis bakteri (Baratawidjaja K.G dan Rengganis I, 2009; Mitchell dan Cotran, 2010).

2. Proliferasi

Tahap kedua dari proses penyembuhan luka didominasi oleh fibroblas, sel endothelial yang bergabung dalam jaringan granulasi, dan makrofag yang berfungsi sebagai sel fagosit, makrofag keluar pada 48 jam pertama hingga 7 hari. Fibroblas merupakan elemen utama dalam proses perbaikan, pembentukan struktur protein dan jaringan. Fibroblas memiliki kemampuan memproduksi kolagen pada hari ke-3 dan akan menumpuk hingga 3 bulan. Selanjutnya akan terbentuk epitel, jejas yang terbuka akan diisi epitel dibawahnya lalu tempat epitel yang bermigrasi diisi oleh sel baru dari proses mitosis. Fibroblas akan berhenti memproduksi epitel saat seluruh luka telah tertutup sempurna (Mitchell dan Cotran, 2010).

3. Remodeling

Tahap ini adalah tahap terakhir dari penyembuhan luka, terjadi pada hari ke-14 sampai 2 tahun. Saat remodeling, terjadi pengembalian baik sel maupun jaringan yang hilang maupun rusak akibat adanya jejas lalu terjadi proses inflamasi. Sel yang berperan dalam remodeling adalah sel epitel dan keratosit yang berguna membentuk epitel dan keratin yang baru sehingga sel maupun jaringan yang telah rusak bisa kembali normal seperti semula. Remodeling yang terjadi, lama waktu, dan meninggalkan bekas luka maupun tidak bergantung pada luas daerah yang terluka, besar kerusakan jaringan, dan faktor

penyembuhan dari dalam tubuh setiap orang (Mitchell dan Cotran, 2010).

2.4 Limfosit

Limfosit berada di dalam sirkulasi dan di dalam berbagai organ.

Walaupun semua limfosit secara morfologik tampak identik, sebenarnya terdapat beberapa populasi limfosit yang berbeda fungsi dan fenotipnya.

Limfosit berkembang dari sel asal (*precursor*) di dalam organ limfoid yang aktif dalam pembentukan sel. Limfosit yang mengalami pematangan di dalam timus disebut limfosit T, sedangkan limfosit B mengalami pematangan di dalam sum-sum tulang (*bone marrow*). Masing-masing limfosit T dan B memaparkan reseptor untuk antigen tunggal dan seluruh populasi limfosit (berjumlah sekitar 10^{12} pada manusia) dan berkemampuan mengenal puluhan atau ratusan juta antigen (Robbins, 2013).

Kedua jenis limfosit akan bermigrasi menuju tempat radang dengan menggunakan pasangan molekul adhesi yang sama dan kemokin yang diperoleh dari leukosit lain. Dalam jaringan limfosit B dapat berubah menjadi sel plasma, yang mensekresi antibodi, dan CD4+ limfosit T diaktifkan untuk mensekresi sitokin. Akibat sekresi sitokin, CD4+ limfosit T menimbulkan radang dan mempengaruhi timbulnya reaksi radang. Ada tiga subset dari CD4+ helper sel T yang mensekresi berbagai sitokin dan mengakibatkan berbagai jenis radang :

- a. Sel T_H1 akan menghasilkan sitokin IFN- γ , yang mengaktifkan makrofag melalui jalur klasik.

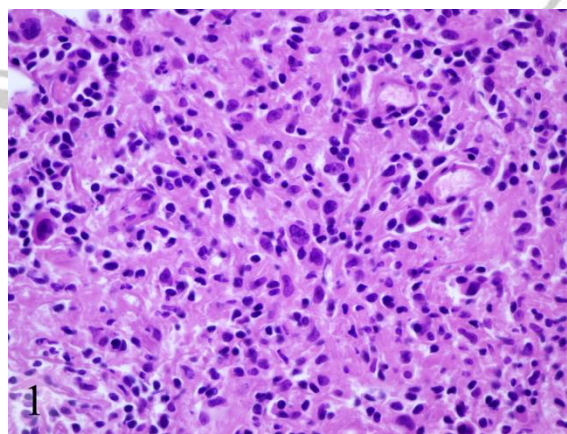
b. Sel T_H2 mensekresi dan mengaktifkan eosinofil yang akan mengumpulkan dan mengaktifkan eosinofil yang berperan pada jalur alternatif untuk pengaktifan makrofag.

c. Sel T_H17 mensekresi IL-17 dan sitokin lain yang menginduksi sekresi kemokin yang berperan untuk pengumpulan neutrofil dan monosit ke dalam reaksi radang.

Kedua sel T_H1 dan T_H17 terlibat dalam pertahanan melawan berbagai jenis bakteri dan virus dan penyakit autoimun. Sel T_H2 penting untuk pertahanan melawan parasit cacing dan pada radang alergi. (Robbins, 2013)

Limfosit dan makrofag akan berinteraksi dua arah, dan interaksi ini berperan penting untuk timbulnya radang kronik. Makrofag akan menyajikan antigen kepada sel T, mengekspresi molekul membran (disebut kostimulator) dan menghasilkan sitokin (IL-2 dan lainnya) yang menstimulasi respon sel T. Limfosit T yang teraktifasi kemudian akan menghasilkan sitokin yang mengumpulkan dan mengaktifasi makrofag dan akan meningkatkan timbulnya antigen dan sekresi sitokin (Robbins, 2013)

Secara mikroskopis, limfosit dapat dilihat seperti :



Gambar 2.6 Gambaran Limfosit Pada Pewarnaan HematoxylinEosin dengan Perbesaran 400x (Journal of Medical Case Reports, 2007)

Dalam penyembuhan luka, limfosit dan makrofag memfagositosis dan mencerna organisme-organisme patologis dan sisa-sisa jaringan. Selain itu limfosit melepaskan limfokin (interferon- γ) yang berpengaruh terhadap agregasi makrofag (Robbins, 2013).

Proses pengaktifan makrofag bukan merupakan proses tunggal. Pengukuran untuk makrofag teraktivasi dapat dilakukan antara lain kemampuan membunuh terhadap mikroba yang sudah difagositosis. Aktivasi makrofag diakibatkan adanya peningkatan transkripsi gen-gen, karena adanya peningkatan ekspresi gen-gen tersebut maka makrofag dapat melakukan fungsi yang tidak dapat dilakukan oleh sel yang sama dalam keadaan istirahat. Sitokin aktivator makrofag yang poten adalah interferon- γ yang dilepaskan oleh limfosit. Makrofag yang teraktivasi memiliki ciri yaitu peningkatan kemampuan killing terhadap mikroorganisme akibat pembentukan *Nitric Oxide* (NO) dan *Reactive Oxygen Species* (ROS), suatu protein yang berperan dalam aktivitas fagositosis (Alderton, 2001).

Makrofag juga melepaskan faktor pertumbuhan diantaranya *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), *Transforming Growth Factor- α* (RGF- α), *Transforming Growth Factor- β* (RGF- β), *Epidermal Growth Factor* (EGF), *Fibroblast Growth Factor* (FGF) dan *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) yang mengawali dan mempercepat pembentukan formasi jaringan granulasi berupa proliferasi fibroblas dan angiogenesis sehingga terjadi penyembuhan luka. (Robbins, 2013; Widjajanto, 2005; Sulistiawati, 2011).

2.5 Sediaan Gel

Gel adalah suatu sistem setengah padat yang terdiri dari suatu dispersi yang tersusun baik dari partikel anorganik yang kecil atau molekul

organik yang besar dan saling diresapi cairan (Depkes, 2000). Makromolekul yang ada pada sediaan disebarkan ke seluruh cairan sampai tidak terlihat ada batas diantaranya, cairan ini disebut gel satu fase. Jika massa gel tersebut terdiri dari kelompok-kelompok partikel kecil yang berbeda, maka gel ini dikelompokkan sebagai sistem dua fase atau *magma* atau susu. Gel dianggap sebagai disperse koloid karena masing-masing mengandung partikel-partikel dengan ukuran koloid (Ansel, 1989)

Gel yang digunakan sebagai sediaan yang diberikan secara oral, topikal, vaginal dan *rectal*. Sediaan gel dibuat seragam dari transparan hingga semi transparan. Komponen utama gel terdiri dari basis gel dan pelembut, surfaktan, zat pengawet, zat aktif, pewarna dan parfum. Beberapa komponen gel :

1. Karbopol 940 merupakan kelompok *acrylic polymer cross-linked* dengan *poly alkenyl ether*. Karbopol digunakan sebageian besar dalam cairan sediaan formulasi semi solid berkenaan dengan farmasi sebagai *suspending agent*. Digunakan pada formulasi krim, gel dan salep.
2. Hidroksi Propil Metil Selulosa (HPMC) serta luas digunakan sebagai suatu eksipien di dalam formulasi pada sediaan topikal dan oral. Dibandingkan dengan metal selulosa, HPMC menghasilkan cairan lebih jernih. HPMC digunakan sebagai zat pengemulsi, agen pensuspensi dan agen penstabil di dalam sediaan salep dan gel.
3. Natrium Karboksil Metil Selulosa (Na CMC) mengandung tidak kurang dari 6,5% dan tidak lebih dari 9,5% Na, dihitung terhadap zat yang lebih dikeringkan. Pemberian serbuk atau butiran putih, tidak berbau atau hampir tidak berbau dan higroskopik. Kelarutan mudah mendispersi



dalam air membentuk suspensi koloidal, tidak larut dalam etanol (95%)

P, dalam eter (Depkes, 1995).

Secara luas sediaan gel banyak digunakan pada produk obat-obatan, kosmetik, dan makanan juga pada beberapa proses industri (Ansel, 1989).

Sediaan gel memiliki beberapa keuntungan, diantaranya :

1. Kemampuan penyebaran baik
2. Efek dingin
3. Tidak ada penghambatan fungsi rambut secara fisiologis
4. Pelepasan obatnya banyak

2.6 Triamcinolone Acetonide 0,1%

Triamcinolone Acetonide 0,1% dental paste adalah golongan kortikosteroid topikal yang memiliki efek antiinflamasi, antialergi dan analgesik sehingga dapat mempercepat penyembuhan ulkus dan mengurangi keparahan lesi. Obat ini diindikasikan untuk pengobatan lesi inflamasi mulut dan lesi ulseratif (Scully, 2003).

Secara mikroskopik, obat ini menghambat fenomena inflamasi dini yaitu edema, deposit fibrin, dilatasi kapiler, migrasi leukosit ketempat radang dan aktivitas fagositosis. Selain itu juga dapat menghambat manifestasi inflamasi yang telah lanjut yaitu proliferasi kapiler dan fibroblas, pengumpulan kolagen dan pembentukan sikatriks (Tjahadewi, 2003).

2.7 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Tikus liar, tikus Norwegia dan tikus coklat adalah hewan semarga dengan tikus laboratorium. Akan tetapi, nama ilmiah tikus liar yaitu *Rattus rattus*. Tikus ini mirip dengan tikus Norwegia dan sering terdapat di kota-kota

di seluruh dunia tetapi jarang dipakai sebagai hewan laboratorium (Smith, 1987). Rattus memiliki intelegensi yang tinggi, makhluk sosial, hidup dalam 2 kelompok atau lebih (Dallas, 2006).

Tikus laboratorium jantan jarang berkelahi seperti mencit jantan.

Selain itu tikus juga lebih besar daripada mencit, sehingga tikus lebih menguntungkan untuk beberapa macam percobaan. Tikus dapat tinggal sendirian di dalam kandang, asalkan dapat melihat dan mendengar tikus lain.

Jika dipegang dengan cara yang benar, tikus-tikus ini tenang dan mudah ditangani di laboratorium (Smith, 2002).

Tikus putih sebagai hewan percobaan relatif resisten terhadap infeksi dan sangat cerdas. Tikus putih tidak begitu bersifat fotofobik seperti halnya mencit dan kecenderungan untuk berkumpul dengan sesamanya tidak begitu besar. Aktifitasnya tidak terganggu oleh adanya manusia di sekitarnya. Terdapat 2 sifat yang membedakan tikus dari hewan percobaan lain, yaitu bahwa tikus tidak dapat muntah karena struktur anatomi yang tidak lazim di tempat esofagus bermuara ke dalam lambung dan tikus tidak mempunyai kandung empedu. (Smith, 2002).

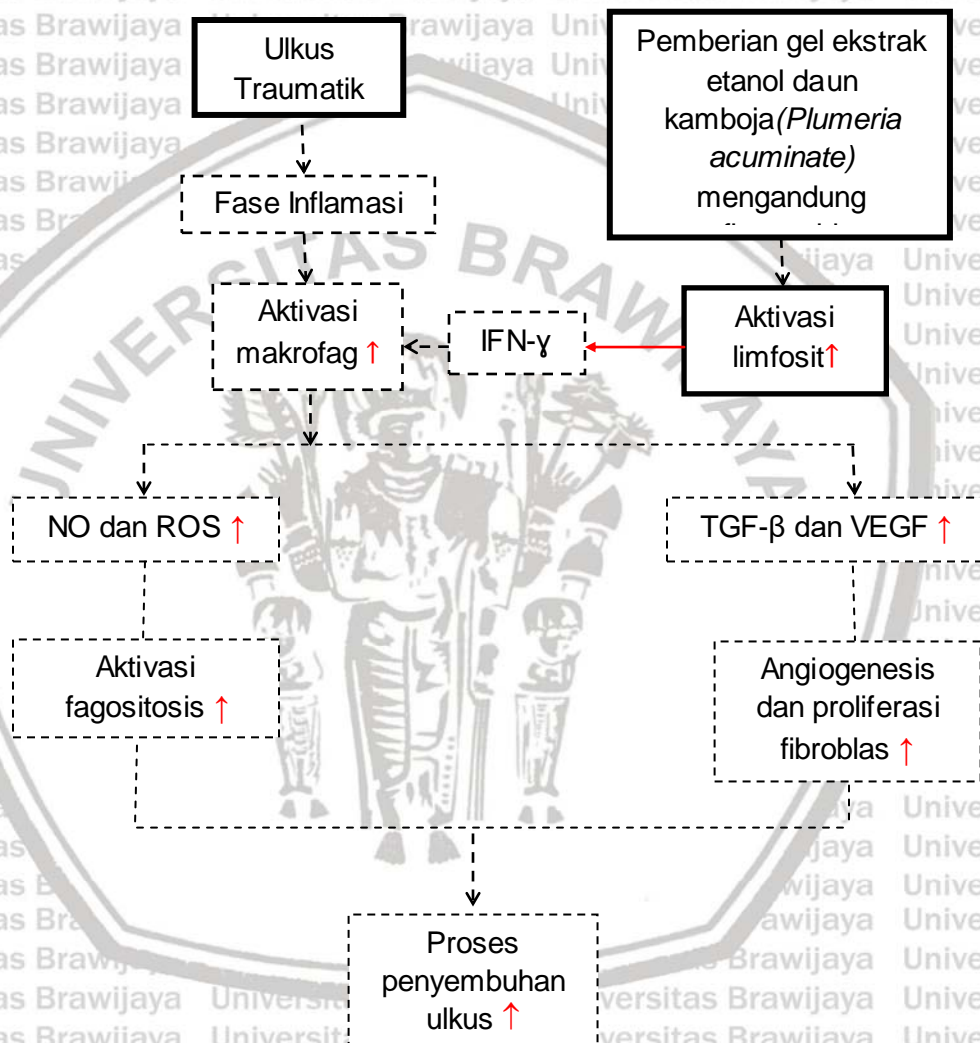
Pada umur 4 minggu biasanya berat tikus 35-40 gram dan berat dewasa rata-rata 200-250 gram, namun bervariasi tergantung pada galur.

Tikus jantan tua dapat mencapai 500 gram tetapi tikus jantan betina jarang lebih dari 350 gram. Galur Sprague Dawley paling besar, hampir sebesar tikus liar (Smith, 2002).

BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan :

———— : variabel yang diteliti

----- : variabel yang tidak diteliti

↑ : efek dari gel ekstrak etanol daun kamboja

Ulkus traumatik adalah suatu ulkus yang disebabkan oleh trauma. Proses penyembuhan ulkus diawali dengan fase inflamasi. Dalam fase inflamasi, limfosit memiliki peran penting yaitu melepaskan limfokin (interferon- γ) yang berpengaruh terhadap agregasi makrofag. Setelah diaktivasi oleh limfosit, makrofag menghasilkan *Nitric Oxide* (NO) dan *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang berperan dalam aktivasi fagositosis serta menghasilkan faktor pertumbuhan berupa *Transforming Growth Factor- β* dan *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) yang berperan dalam proliferasi fibroblast dan angiogenesis, sehingga terjadi penyembuhan ulkus.

Gel ekstrak etanol daun kamboja (*Plumeria acuminata*) mengandung flavonoid yang berfungsi merangsang rekutmen sel radang, salah satunya adalah limfosit yang akan meningkatkan aktivasi makrofag yang juga akan meningkatkan aktivasi fagositosis serta proliferasi fibroblas dan angiogenesis, sehingga proses penyembuhan ulkus meningkat.

3.2 Hipotesis Penelitian

Gel ekstrak etanol daun kamboja (*Plumeria acuminata*) akan meningkatkan jumlah limfosit pada proses penyembuhan ulser mukosa *Rattus norvegicus* yang diinduksi panas.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan dan Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimental menggunakan rancangan penelitian "*Post Test Only Randomized Control Group Design*" di laboratorium secara in-vivo untuk mengetahui pengaruh gel ekstrak etanol daun kamboja (*Plumeria acuminata*) terhadap peningkatan jumlah limfosit pada proses penyembuhan ulkus mukosa labial *Rattus norvegicus* yang diinduksi panas.

Sampel dipilih dengan menggunakan tehnik "*Simple Random Sampling*" kemudian di tempatkan dalam 3 kelompok yaitu :

K (-) : Kelompok kontrol negatif

Tikus putih yang diinduksi panas untuk ulserasi dan tidak diberikan perlakuan selama 5 hari.

K (+) : Kelompok kontrol positif

Tikus putih yang diinduksi panas untuk ulserasi, pasca ulserasi diaplikasikan *Triamcinolone acetone* 0,1% 2 kali sehari dalam 5 hari.

P : Kelompok perlakuan

Tikus putih yang diinduksi panas untuk ulserasi, pasca ulserasi diaplikasikan gel ekstrak etanol daun kamboja (*Plumeria acuminata*) dengan konsentrasi 10% 2 kali sehari dalam 5 hari.

4.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar yang berumur 3 bulan dengan berat 180-200 gram.

Jumlah pengulangan penelitian dihitung menggunakan rumus Federer

adalah sebagai berikut :

$$(n-1)(t-1) \geq 15$$

Keterangan :

t = jumlah kelompok

n = jumlah pengulangan penelitian (Federer, 1963)

Pada penelitian ini $t=3$, sehingga jumlah pengulangan penelitian adalah :

$$(n-1)(3-1) \geq 15$$

$$2n \geq 15$$

$$n \geq 8,5$$

Pada penelitian ini digunakan minimal 9 tikus putih untuk tiap kelompoknya. Penelitian ini dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan, sehingga dibutuhkan 27 tikus putih. Untuk mengurangi *lost of sampel* di tengah-tengah penelitian karena tikus putih mati, maka jumlah sample ditambah menjadi 3 ekor tikus putih.

Kriteria Inklusi :

1. Tikus putih galur Wistar keturunan murni
2. Berjenis kelamin jantan
3. Belum pernah digunakan untuk penelitian
4. Umur 3 bulan
5. Berat badan 180-200 gram

Kriteria Eksklusi :

1. Tikus putih sakit selama masa adaptasi 10 hari (tikus putih tidak bergerak aktif)
2. Tikus putih mati selama perlakuan berlangsung

3. Terlihat tanda-tanda infeksi disekitar luka

4.3 Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah gel ekstrak etanol daun kamboja (*Plumeria acuminata*) dengan konsentrasi 10%.

2. Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah sel limfosit.

3. Variabel kendali

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah :

1. Genetika
2. Jenis kelamin
3. Umur
4. Berat badan
5. Makanan dan minuman yang dikonsumsi objek penelitian
6. Kemungkinan adanya infeksi
7. Aplikasi ekstrak etanol daun kamboja (*Plumeria acuminata*)

4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmasi, Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Penelitian dilakukan mulai bulan Agustus sampai bulan Oktober 2015.

4.5 Bahan dan Alat Penelitian

4.5.1 Bahan dan Alat untuk Ulserasi

1. Tikus putih jantan umur 3 bulan dengan berat badan 180-200 gram
2. Cement stopper
3. Bunsen

4. *Chlorethil*

5. *Pinset*

6. *Kapas*

7. *Masker*

8. *Sarung tangan*

4.5.2 Bahan dan Alat untuk Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Kamboja (*Plumeria acuminata*)

1. Daun kamboja (*Plumeria acuminata*)

2. *Oven*

3. *Blender*

4. *Kertas saring*

5. *Soxhlet*

6. *Etanol 70 %*

7. *Tabung steril*

8. *Heating mantle*

9. *Kondensor*

10. *Labu evaporator*

11. *Rotary evaporator*

12. *Masker*

13. *Sarung tangan*

4.5.3 Bahan dan Alat untuk Pembuatan Gel Ekstrak Etanol Daun Kamboja (*Plumeria acuminata*)

1. Ekstrak etanol daun kamboja (*Plumeria acuminata*)

2. *Bejana*

3. *Metilparaben*

4. Propilenglikol
5. Carbomer934 3%
6. NaOH 1%
7. Aquadest
8. Tube
9. Masker
10. Sarung Tangan

4.5.4Bahan dan Alat Perlakuan

1. Tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) umur 3 bulan dengan berat 180-200 gram yang diinduksi panas dengan ujung cement stopper kedokteran gigi sehingga terdapat ulkus traumatik pada mukosa labialnya.
2. Gel ekstrak etanol daun kamboja (*Plumeria acuminata*)
3. Cotton buds
4. Masker
5. Sarung tangan

4.5.5 Bahan dan Alat Pengambilan Jaringan dan Pembuatan Preparat

1. Either
2. Scalpel
3. Microtom
4. Kaca obyek dan penutup
5. Blok paraffin
6. Waterbath
7. Tempat pewarnaan dan cucian
8. Kertas saring

9. *Timer*
10. *Formalin 10%*
11. *Aceton*
12. *Xylol*
13. *Kuas kecil*
14. *Gelatin*
15. *Alkohol 96%*
16. *Pewarnaan Hematoxylin dan Eosin*
17. *Lithium carbonat*

4.6 Definisi Operasional

1. Gel ekstrak etanol daun kamboja (*Plumeria acuminata*) adalah gel yang didapat dengan mengekstrak daun kamboja dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Pada penelitian ini dibuat konsentrasi ekstrak etanol daun kamboja mencapai 10%. Gel ekstrak etanol daun kamboja (*Plumeria acuminata*) dibuat dengan cara ekstrak daun kamboja dicampur dengan Na-CMC sebagai *gelling agent*. Kriteria daun yang dipilih adalah daun yang berwarna hijau tua. Daun kamboja diperoleh di Balai Materia Medica adalah salah satu Unit Pelaksana Teknis (UPT) dari Dinas Kesehatan Propinsi Jawa Timur yang berlokasi di Batu.
2. Penghitungan jumlah limfosit adalah penghitungan jumlah sel limfosit pada preparat eksisi biopsi jaringan sekitar ulkus pada hari ke-5 pasca ulserasi dengan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE) dan diamati sebanyak 5 lapang pandang menggunakan software OlyVIA (*Olympus Viewer for Imaging Applications*) dengan perbesaran 400 kali tiap

lapang pandangnya. Pada teknik pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE), limfosit akan terpulas berwarna ungu muda dan terlihat inti sel berbentuk bulatan besar yang berwarna ungu gelap.

4.7 Prosedur Penelitian atau Pengumpulan Data

4.7.1 Ulserasi Pada Mukosa Labial Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Sebelum ulserasi pada mukosa labial, sejumlah tikus putih dilakukan adaptasi di laboratorium dengan dikandangkan secara individual hal ini untuk mencegah suhu badan meningkat di atas normal dan diberi pakan standar selama 10 hari. Setelah 10 hari adaptasi, mukosa labial tikus putih jantan dianestesi *chloretil*, kemudian diinduksi dengan ujung *cement stopper* kedokteran gigi yang sebelumnya telah dipanaskan dengan bunsen selama 10 detik sehingga terbentuk ulkus, kemudian dimasukkan kedalam kandang yang telah diberi label kelompok kontrol negatif (-), kelompok kontrol positif (+) dan kelompok perlakuan (P).

4.7.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Kamboja (*Plumeria acuminata*)

Daun kamboja yang digunakan sebelumnya ditimbang terlebih dahulu dan didapatkan berat daun kamboja 2500 gram. Daun kamboja dikeringkan menggunakan oven pada suhu 60-80°C sampai kering. Setelah kering, daun kamboja dihaluskan menggunakan *blender* dan diayak untuk memisahkan bagian yang masih kasar. Setelah itu, ditimbang sebanyak 200 gram dan dibungkus menggunakan kertas saring. Daun kamboja yang telah terbungkus kertas saring tersebut dimasukkan dalam alat soxhlet yang labu alas bulatnya telah diisi

menggunkan etanol 70% sebanyak 250-400 ml. Heating mantle set suhu pemanas dinyalakan 60-80°C, alirkan air pada kondensor dan proses ekstraksi dilakukan sampai hasil ekstraksi jernih (sekitar 9-12 kali putaran pelarut. Setelah proses ekstraksi selesai, hasil ekstrak diambil dan dimasukkan dalam labu evaporator. Pelarut diuapkan menggunakan rotary evaporator sampai tidak keluar lagi pada labu alas bulat tempat sisa penampung pelarut.

4.7.3 Pembuatan Gel Ekstrak Daun Kamboja (*Plumeria acuminata*)

Ekstrak etanol daun kamboja dilarutkan dalam sebagian air yang telah dipanaskan pada suhu 50°C kemudian Na-CMC 1,25 gram dan diaduk hingga homogen. Ditambahkan gliserin propilenglikol dan air dengan pengadukan secara terus-menerus hingga terbentuk gel. Gel yang telah terbentuk kemudian disimpan pada suhu ruangan selama 24 jam (Hamzah, 2006).

4.7.4 Pengaplikasian Gel Ekstrak Etanol Daun Kamboja (*Plumeria acuminata*) dan Triamcinolone acetonide 0,1%

Setelah 1 hari ulserasi, pada kelompok perlakuan dilakukan aplikasi gel ekstrak etanol daun kamboja (*Plumeria acuminata*) selama 2 kali sehari. Sedangkan pada kelompok kontrol positif dilakukan aplikasi Triamcinolone acetonide 0,1% selama 2 kali sehari dan kelompok negatif tidak diberi perlakuan. Dilakukan aplikasi yang sama pada hari ke-4. Pada hari ke-5, semua tikus putih tiap kelompok dikorbankan dan diambil jaringan sekitar ulkus untuk pembuatan preparat.



1.7.5 Pembuatan Preparat

1. Proses Pemotongan Jaringan Berupa Makros

1. Grossatausampel jaringan hasil bedah dimasukkan ke larutan formalin 10% (fiksasi) semalam
2. Untuk jaringan keras (tulang, gigi) jaringan dilakukan dekalsifikasi (pengembukan) 15 sampai dengan 20 hari menggunakan EDTA
3. Jaringan dipilih yang terbaik sesuai dengan yang akan diteliti
4. Jaringan dipotong kurang lebih ketebalan 2-3 mm
5. Di masukkan ke kaset dan diberi kode sesuai dengan kode gross penelitian
6. Dicuci dengan air mengalir sebelum di lakukan proses jaringan atau dimasukkan ke alat Tissue Tex Prosesor
7. Di proses menggunakan alat mesin Automatis Tissue Tex Prosesor (*automatic proccesing*)
8. Alarm bunyi tanda selesai

2. Prosedur Pengeblokan dan Pemotongan Jaringan

1. Jaringan di angkat dari mesin Tissue Tex Prosesor
2. Jaringan di blok dengan paraffin sesuai kode jaringan
3. Jaringan dipotong dengan menggunakan *Microtome* dengan ketebalan 3-5 mikron

3. Proses Deparafinisasi

Setelah disayat atau di potong dengan ketebalan 3-5 mikron ditaruh di oven selama 30 menit dengan suhu panas 70-80 derajat, kemudian dimasukkan ke dalam 2 tabung larutan *syol* masing-masing 20 menit, setelah itu di masukkan ke 4 tabung alkohol

masing-masing tempat 3 menit (hidrasi), dan yang terakhir dimasukkan air mengalir selama 15 menit.

4. Proses Pewarnaan *Hematoxylin-Eosin* atau *Auto Staining*

1. Cat utama Harris Hematoksin selama 10-15 menit
2. Cuci dengan air mengalir selama 15 menit
3. Alkohol asam 1% 2-5 celup
4. Amonia air 3-5 celup
5. Cat pembanding

Eosin 1% selama 10-15 menit

Dehidrasi :

- a. Alkohol 70% selama 3 menit
- b. Alkohol 80% selama 3 menit
- c. Alkohol 96% selama 3 menit
- d. Alkohol absolut selama 3 menit

Penjernihan (*Clearing*) :

- a. *Xylo* selama 60 menit
- b. *Xylo* selama 60 menit

Mounting dengan entelan dan *coverglass* :

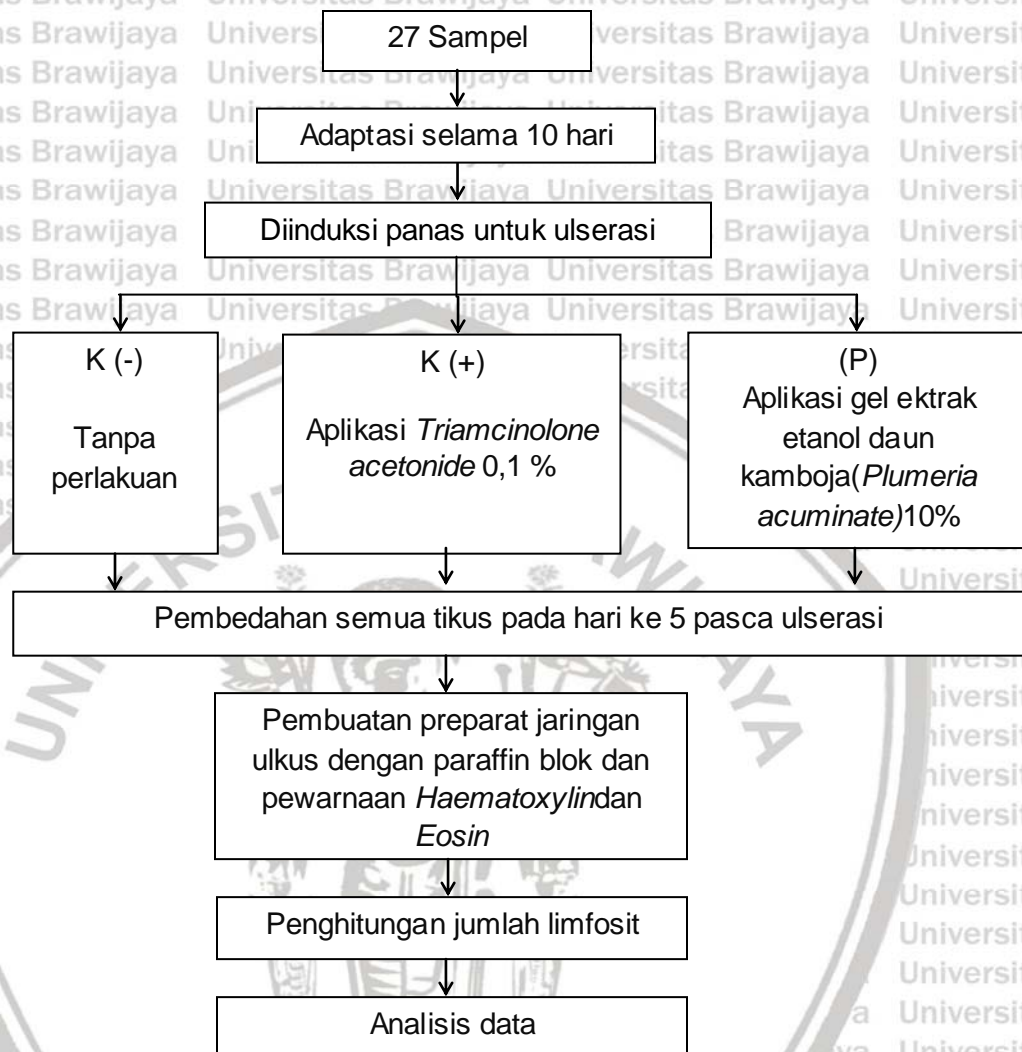
Biarkan slide kering pada suhu ruangan. Setelah slide kering, slide siap untuk diamati.

4.7.6 Identifikasi Limfosit

Limfosit merupakan sel yang memiliki inti bulat atau oval yang dikelilingi oleh pinggiran sitoplasma sempit berwarna biru pada pewarnaan *HaematoxylinEosin*. Pengamatan dilakukan sebanyak 5 lapang pandang menggunakan software OlyVIA (*Olympus Viewer for Imaging Applications*) dengan pembesaran 400 kali tiap lapang pandangnya.



4.8 Kerangka Operasional



Gambar 4.1 Kerangka Operasi Penelitian

4.9 Analisis Data

Analisis data yang digunakan adalah uji normalitas dan uji varian. Data yang diperoleh diuji normalitasnya menggunakan uji *Shapiro-Wilk* karena besar sampel ≤ 50 . Kemudian dilakukan uji homogenitas ragam menggunakan *Levene's test*. Apabila data yang diperoleh berdistribusi normal (*signifikansi* $> 0,05$) dan homogenitas ragam terpenuhi ($p > 0,05$), maka digunakan uji *one way Anova* sebagai uji hipotesisnya. Uji *one way Anova* bertujuan untuk mengetahui perbedaan jumlah sel limfosit antara kelompok tanpa perlakuan, aplikasi *Triamcinolone acetonide* 0,1% dan aplikasi ekstrak gel etanol daun kamboja (*Plumeria acuminata*) pada proses penyembuhan ulser mukosa *Rattus norvegicus* yang diinduksi panas. Apabila data berdistribusi tidak normal dan varian data tidak homogen maka digunakan uji *Kruskal Wallis*. Selanjutnya, dilakukan uji *Post Hoc Tukey* sebagai lanjutan *one way Anova* atau uji *Mann Whitney* sebagai uji lanjutan *Kruskal Wallis*.



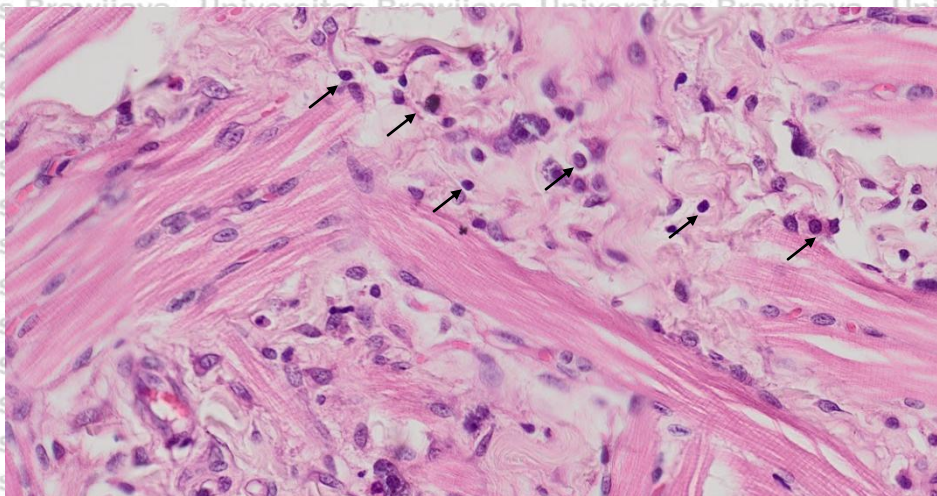
BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

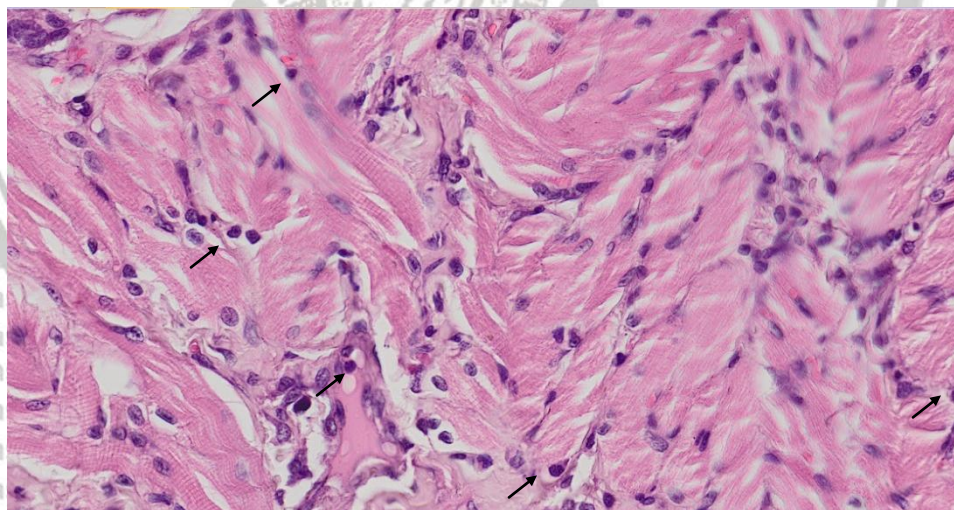
Pada penelitian ini hewan coba dibagi menjadi 3 kelompok yaitu, kelompok kontrol negatif (tikus putih yang diinduksi panas dengan ujung *cement stopper* untuk ulserasi dan tidak diberikan perlakuan selama 4 hari), kelompok kontrol positif (tikus putih yang diinduksi panas dengan ujung *cement stopper* untuk ulserasi dan diaplikasikan *Triamcinolone acetonide* 0,1%2 kali sehari selama 4 hari) dan kelompok perlakuan (tikus putih yang diinduksi panas dengan ujung *cement stopper* untuk ulserasi dan diaplikasikan gel ekstrak etanol daun kamboja (*Plumeria acuminata*) 2 kali sehari selama 4 hari).

Sampel didapatkan dengan mengambil jaringan mukosa (*Rattus norvegicus*) yang didekaputasi pada hari kelima pasca pembuatan ulser kemudian dilakukan pembuatan preparat dengan pengecatan *Haematoxylin-Eosin*. Berdasarkan gambar hasil pewarnaan *Haematoxylin-Eosin* yang diamati menggunakan software OlyVIA (*Olympus Viewer for Imagine Applications*) dengan perbesaran 400 kali, didapatkan gambaran limfosit dengan bentukan bulat atau oval dengan sitoplasma sempit berwarna biru keunguan.



Gambar 5.1 Gambaran Limfosit Kelompok Kontrol Negatif Pada Pewarnaan *Haematoxylin-Eosin* dengan perbesaran 400x

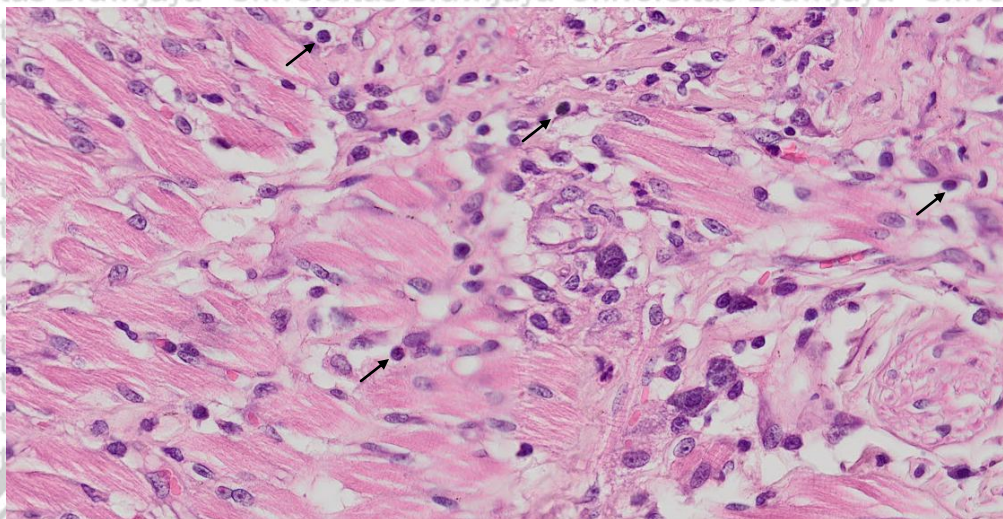
Berdasarkan gambar 5.1 Jaringan ulkus mukosa tikus putih pada kelompok kontrol negatif tampak gambaran limfosit yang ditandai dengan tanda panah memiliki jumlah yang banyak.



Gambar 5.2 Gambaran Limfosit Kelompok Kontrol Positif Pada Pewarnaan *Haematoxylin-Eosin* dengan perbesaran 400x

Berdasarkan gambar 5.2 Jaringan ulkus mukosa tikus putih pada kelompok kontrol positif tampak gambaran limfosit yang ditandai dengan

tanda panah memiliki jumlah yang lebih sedikit dibandingkan dengan kontrol negatif.



Gambar 5.3 Gambaran Limfosit Kelompok Perlakuan Pada Pewarnaan *Haematoxylin-Eosin* dengan perbesaran 400x

Berdasarkan gambar 5.3 Jaringan ulkus mukosa tikus putih pada kelompok perlakuan tampak gambaran limfosit yang ditandai dengan tanda panah memiliki jumlah yang lebih sedikit dibandingkan dengan kontrol negatif dan kontrol positif.

Untuk analisa data hasil penghitungan limfosit ditulis dengan format $\text{mean} \pm \text{standar deviasi}$.

Tabel 5.1 Hasil Penghitungan Rata-rata Jumlah Limfosit

Kelompok	Mean	Standar Deviasi
Kontrol Negatif	51,89	1,269
Kontrol Positif	27,44	1,014
Perlakuan	22,44	0,882

5.2 Analisa Data

Data hasil penelitian berupa jumlah limfosit dianalisis menggunakan metode *one way Anova*. Sebelum dilakukan pengujian dengan *one way Anova*, dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas ragam. Uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* dan Uji homogenitas menggunakan *Levene's Test*.

Pada uji *one way Anova*, hipotesis ditentukan melalui suatu rumusan yaitu H_0 diterima jika signifikansi yang diperoleh $>0,05$. H_0 dari penelitian ini adalah gel ekstrak etanol daun kamboja (*Plumeria acuminata*) tidak berpengaruh meningkatkan jumlah limfosit dalam proses penyembuhan ulkus mukosa tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi panas, sedangkan H_1 dari penelitian ini adalah gel ekstrak etanol daun kamboja (*Plumeria acuminata*) berpengaruh meningkatkan jumlah limfosit dalam proses penyembuhan ulkus mukosa tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi panas.

5.2.1 Uji Normalitas Data

Pengujian normalitas dilakukan dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Uji normalitas terpenuhi jika nilai signifikansi hasil penghitungan $p > 0,05$.

Didapatkan hasil pengujian normalitas sebagai berikut :

Table 5.2 Uji Normalitas Limfosit

	Shapiro/p	Sig.	Keterangan
Limfosit	949	0,201	Normal

Berdasarkan pada tabel diatas didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,201. Jika nilai signifikansi dibandingkan dengan $p=0,05$ maka dapat disimpulkan bahwa nilai signifikansi lebih besar daripada 0,05. Sehingga dari pengujian in dapat diketahui bahwa uji normalitas telah terpenuhi dan data berdistribusi normal.

5.2.2 Uji Homogenitas Ragam

Pengujian homogenitas ragam dilakukan dengan menggunakan *Levene's Test*. Uji homogenitas ragam dikatakan terpenuhi jika nilai signifikansi hasil perhitungan $p>0,05$. Dari Hasil analisa data didapatkan pengujian homogenitas ragam sebagai berikut.

Tabel 5.3 Uji Homegenitas Ragam Limfosit

<i>Levene Statistic</i>	<i>Sig.</i>
0,109	0,897

Berdasarkan pada tabel diatas, didapatkan koefisien *Levene statistis* sebesar 0,109 dengan nilai signifikansi sebesar 0,897 jika nilai signifikansi dibandingkan dengan $p=0,05$ maka dapat disimpulkan bahwa nilai signifikansi lebih besar daripada 0,05. Sehingga, dari pengujian ini dapat diketahui bahwa uji homogenitas ragam telah terpenuhi.

5.2.3 Uji One Way Anova

Setelah kedua pengujian yang melandasi uji *one way Anova* telah terpenuhi, selanjutnya dilakukan pengujian untuk mengetahui perubahan jumlah limfosit. Sebagaimana telah dijelaskan dalam metode penelitian,

hewan coba diberikan aplikasi gel ekstrak etanol daun kamboja (*Plumeria acuminata*) pada kelompok perlakuan. Aplikasi *Triamcinolone acetonide* 0,1% pada kelompok kontrol positif dan tanpa perlakuan pada kelompok kontrol negatif. Berikut hasil penghitungan uji *one way Anova*.

Tabel 5.4 Uji *One Way Anova*

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4468,519	2	2234,259	1961,789	0,000
Within Groups	27,333	24	1,139		
Total	4496,852	26			

Berdasarkan pada tabel diatas, didapatkan sumber keragaman (SK) Perlakuan memiliki nilai F-hitung sebesar 1961,789 dengan signifikansi sebesar 0,000. Nilai F-hitung tersebut lebih besar dari pada F-tabel pada taraf 5% serta nilai signifikansi yang didapatkan dari proses penghitungan lebih kecil daripada $p=0,05$. Sehingga dari pengujian ini dapat diketahui bahwa terdapat pengaruh yang signifikan penggunaan gel ekstrak etanol daun kamboja (*Plumeria acuminata*) terhadap jumlah limfosit pada proses penyembuhan ulkus mukosa tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi panas. Dengan kata lain, terdapat perbedaan yang signifikan jumlah limfosit dari setiap kelompok.

5.2.4 Uji *Post Hoc* Tukey

Uji ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan rata-rata dari ketiga kelompok perlakuan. Metode *Post-Hoc* yang digunakan adalah Uji HSD.

Pada uji ini, suatu data dikatakan berbeda secara bermakna apabila nilai signifikansi $p < 0,05$ serta pada interval kepercayaan 95%. Berdasarkan uji tersebut didapatkan hasil sebagai berikut.

Tabel 5.5 Uji *Post Hoc* Turkey

	K(-)	K(+)	P
K(-)	22,44		
K(+)		27,44	
P			51,89
Sig.	1,000	1,000	1,000

Berdasarkan hasil uji tersebut, dapat dijelaskan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara setiap kelompok.